

ÜBER DIE WIRKUNG VON PHENOBARBITAL
AUF VERSCHIEDENE ENZYME DES
KOHLENHYDRATSTOFFWECHSELS IN DER
LEBER FÖTALER UND NEUGEBORENER
RATTEN

Almuth Friedrich-Freksa

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Hauner'schen Kinderspital
Direktor: Prof.Dr. K. Betke

Über die Wirkung von Phenobarbital
auf verschiedene Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels
in der Leber fötaler und neugeborener Ratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Almuth Friedrich-Frekxa
aus
Tübingen

1975

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. Schaub

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1975



Inhalt

Einleitung	Seite	5
Material und Methoden	Seite	8
Ergebnisse	Seite	13
Diskussion	Seite	28
Zusammenfassung	Seite	32
Literaturverzeichnis	Seite	33

Einleitung

Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Entwicklung der Leber in vielen tierischen Organismen wie auch beim Menschen noch nicht abgeschlossen. Die Umstellung vom intra- zum extrauterinen Leben schafft neue Stoffwechselbedingungen. Aufgaben, die die Plazenta und die Mutter erfüllten, muß die Leber des Neugeborenen übernehmen, Regulationssysteme, die sich in utero erübrigten, sind nach der Geburt erforderlich. Ein Beispiel aus dem Kohlenhydratstoffwechsel bietet das Regulationssystem zur Konstanterhaltung des Blutglucosespiegels: der Föt wird von einem gleichmäßig fließenden Glucosestrom der Mutter versorgt, das Neugeborene jedoch muß die Fähigkeit erwerben, aus der Leber Glucose ins Blut freizusetzen, sei es durch Glykogenabbau oder durch Gluconeogenese aus Metaboliten des Eiweiß- und Fettstoffwechsels. Um diese Reaktion zu ermöglichen ist ein bestimmtes Enzymmuster der Leberzelle erforderlich.

Man kennt Beispiele der Enzymkontrolle durch Hormone (nachzuweisen durch eine veränderte Synthese- oder Abbaurate des Enzyms), man kennt aber auch körperfremde Substanzen und zwar sehr verschiedener chemischer Stoffklassen, die Enzyme inhibieren oder induzieren. Eine dieser Substanzen ist Phenobarbital, ein langwirkendes Hypnoticum aus der Gruppe der Barbiturate. R e m m e r hat 1958 zum ersten Mal unter Phenobarbitaleinfluß eine Steigerung der Aktivität medikamenteabbauender Enzyme bei Ratten gefunden, gleichzeitig die Zunahme zytoplasmatischer Membranen, im besonderen des glatten, nicht mit Ribosomen besetzten endoplasmatischen Retikulums (ER) (23).

Aus mehreren Untersuchungen geht hervor, daß zwischen ER bzw. arzneimittelabbauenden Enzymen und Glykogenstoffwechsel eine Beziehung besteht. Die Befunde sind jedoch unterschiedlich: dem Ergebnis von R o g e r s (26), der nach Phenobarbitalbehandlung paralleles Verhalten von Enzymaktivität und Glykogenkonzentration in der Leberzelle fand, stehen die Arbeiten von P o r t e r (22) und J a p u n d c ŝ i ć (14) gegenüber, die nach Phenobarbitalbehandlung ein reziprokes Verhältnis von Enzymaktivität und Glykogenkonzentration fanden,

sowie R e m m e r s elektronenmikroskopische Studie, die zeigte, daß für Glykogen gehaltene Partikel bei Zunahme des ER unter Phenobarbitalwirkung verschwanden; biochemisch ließ sich allerdings von ihm keine quantitative Glykogenverminderung bestätigen.

Vor und nach der Geburt ist der Glykogengehalt der Leber einer starken physiologischen Schwankung unterworfen. Die Glykogensynthese setzt bei Kaninchen, Ratte und Hund erst im letzten Viertel der Schwangerschaft ein, während die Leber des Affen und des Menschen sehr viel früher dazu befähigt ist (1). In allen Fällen findet aber zu einem für die verschiedenen Arten spezifischen Zeitpunkt, meist kurz vor der Geburt, eine rasch zunehmende Glykogenspeicherung in der Leber statt (3).

Noch rascher als die Synthese pränatal erfolgt der Abbau des Glykogens unmittelbar nach der Geburt. In der menschlichen Leber verschwindet das Glykogen innerhalb weniger Stunden als Ausdruck erhöhter Stoffwechselleistung und der damit vermehrten Glucoseutilisation des Neugeborenen (33). Unter diesen Verhältnissen fand R o s e n bei fötalen und neugeborenen Mäusen hohe Glykogenkonzentration mit geringer ER-Konzentration korreliert und umgekehrt (27). Es liegt nahe, als Verbindungsglied zwischen ER und Glykogenstoffwechsel ein strukturgebundenes Enzym zu suchen. Die Glucose-6-phosphatase, als einziges Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels in der Mikrosomenfraktion zu finden, ist zwar nicht unmittelbar am Glykogenstoffwechsel beteiligt, sie kann jedoch aus dem durch Glykogenolyse entstehenden Glucose-6-phosphat Glucose freisetzen, somit die Höhe der Blutglucosekonzentration bestimmen. Sie zeigt in ihrer Aktivitätsentwicklung perinatal ein charakteristisches Verhalten, das in Beziehung gestellt werden könnte zu dem Glykogengehalt der Leber in demselben Zeitraum.

Eine Stellung als Schlüsselenzym für die Glykogenolyse - zumindest unmittelbar nach der Geburt - wurde diskutiert (33, 30). Bei der Ratte nimmt die pränatal minimale Aktivität post partum rasch um ein Vielfaches zu und erreicht am ersten Lebenstag die doppelte Aktivität derer des erwachsenen Tieres.

Fehlende oder zu geringe Aktivität dieses Enzyms könnte der häufig zu beobachtenden Hypoglykämie bei Frühgeborenen und termingerecht geborenen, aber untergewichtigen Kindern zugrunde liegen wie auch die transitorische Neugeborenenhypertilluinämie auf eine unzureichende Aktivität eines Enzyms, der Glucuronyltransferase zurückgeführt wurde (18). Diese ist am ER lokalisiert, konjugiert Bilirubin, Gifte wie Phenol und Arzneimittel und macht sie dadurch ausscheidungsfähig. Im Tierversuch wird sie bei Mäusen (6), Kaninchen (7) und Ratten (31) durch Barbiturate induziert. Auch beim Menschen (32) wurde dieser Effekt beobachtet (32) und therapeutisch genutzt (18). Schreier (29) hat allerdings kürzlich andere Faktoren wie fehlende Transportproteine und besondere Membraneschaffheiten für dieses Krankheitsbild verantwortlich gemacht und die niedrige Aktivität der Glucuronyltransferase als sekundäre Erscheinung betrachtet.

In der folgenden Arbeit wurde an Ratten untersucht, ob die Leber in einem bestimmten Abschnitt der Fötal- und Neugeborenenperiode unter Phenobarbitalbehandlung Veränderungen in Stoffwechselvorgängen, die nicht in unmittelbarer Beziehung zum Medikamentenabbau stehen, zeigt. Uns interessierte der Glykogenstoffwechsel, vor allem im Hinblick auf eine eventuelle therapeutische Beeinflussung der Neugeborenenhypoglykämie beim Menschen durch dieses Medikament, bzw. im Hinblick auf Nebenwirkungen, die es, in der Neugeborenenperiode angewendet, haben könnte. Wir bestimmten dazu zwölf verschiedenen Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels, die mit Ausnahme der Glucose-6-Phosphatase und der lysosomalen α -Glucosidase in der löslichen Fraktion eines Leberhomogenates zu finden sind, und versuchten, aus den Befunden Rückschlüsse auf die Bevorzugung oder Benachteiligung bestimmter Stoffwechselwege unter Phenobarbitalbehandlung zu ziehen.

Material und Methoden

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Wistar Ratten Stamm AF Han (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, 3 Hannover-Linden, Lettow-Vorbeck-Allee 57) verwendet. Die Tiere erhielten Futter (Altromin, Standard Diät) und Wasser ad libitum. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 200 und 300 g. Eine männliche und eine weibliche Ratte wurden für 24 Stunden zur Paarung zusammengesetzt und Mitternacht als Zeitpunkt der Befruchtung angenommen. Die Muttertiere wurden durch Dekapitation getötet und die Föten aus den Uterushörnern entfernt und ebenfalls durch Dekapitation getötet. Die Tiere wurden so weit wie möglich entblutet. Zwischen männlichen und weiblichen Föten wurden keine Unterschiede gemacht. Den Tieren wurde die Leber entnommen, diese entweder sofort homogenisiert oder bei -20°C aufbewahrt. Die fötalen Lebern eines Wurfes wurden gepoolt. Dabei wurde beachtet, daß alle Föten die gleiche Größe hatten. "Small-for-dates" wurden verworfen. Die neugeborenen Ratten wurden ebenfalls durch Dekapitation getötet. Eine Leber reichte dabei für die verschiedenen Enzymassays aus.

Injektion von Phenobarbital

Phenobarbital Natrium (Merck 500518) wird in steriler physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Die Injektionsdosis ist 50 mg/kg Körpergewicht, jeweils 3mal im Abstand von 24 Stunden intraperitoneal.

Die Tiere werden 24 Stunden nach der 3. Injektion getötet. Als Kontrolle wurden unbehandelte Tiere verwendet, nachdem eine Prüfung ergeben hatte, daß sich Tiere, denen 3mal im Abstand von 24 Stunden eine der Phenobarbitalinjektion entsprechende Menge NaCl-Lösung verabreicht wurde, nicht von unbehandelten unterscheiden.

Enzymbestimmung

Das Gewebe wurde entweder in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator oder mit dem Sonifier (Branson-Sonifier B 10 Mikrospritze) homogenisiert.

Folgende Puffer wurden zum Homogenisieren verwendet:

Destilliertes Wasser für die Bestimmung der α -Glucosidase. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:100. Saccharose 0,25 M, EDTA 0,001M, pH 7,0 für die Bestimmung der Glucose-Phosphatase und der Phosphorylase (Bestimmung des anorganischen Phosphors). Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:100. Saccharose 0,4M, EDTA 0,005M, pH 7,0 für die Bestimmung der Glykogensynthetase. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10. $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1M, EDTA 0,04M, pH 7,3 für die Bestimmung von G6PDH, 6PGDH, PGI, PGM, F1,6DPase und Phosphorylase (opt. Test). Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10.

Der Extrakt wurde bei 1000 g für 30 Minuten in der Kälte zentrifugiert, um große Partikel zu entfernen. Die Enzyme wurden im Überstand gemessen.

Das Protein wurde im Gesamtextrakt mit einer Mikromodifikation der Biuret-Methode bestimmt (2).

Die folgenden Enzyme wurden mit dem optischen Test in einem Appendorf-Photometer bestimmt bei 366 nm oder 334 nm, 25°C mit Standard-Methoden (5).

- Glucose-6- phosphat-Dehydrogenase: TPA 50mM, EDTA 5mM, NADP 1mM, G6P 2mM, pH 7,6.
- 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase : TPA 50mM, EDTA 5mM, MgSO_4 8mM, NADP 1mM, 6PG 0,6mM, pH 7,6.
- Phosphoglucoseisomerase : TPA 50mM, EDTA 5mM, NADP 0,5mM, F6P 2mM, G6PDH 5 μ g, pH 7,6.
- Phosphoglucomutase : TPA 50mM, EDTA 5mM, NADP 1mM, MgSO_4 8mM, Cysteinchlorid 10mM, G1,6P 0,02 mM, G6PDH 5 μ g, pH 7,6.
- Fructose-1,6-diphosphatase : TPA 50mM, EDTA 1mM, MgSO_4 20mM, NADP 0,5mM, Cysteinchlorid 5mM, F1,6P 0,1mM, G6PDH 2,5 μ g, PGI 25 μ g, pH 7,2.
- Phosphorylase : TPA 50mM, EDTA 5mM, MgCl_2 10mM, Na_2HPO_4 10mM, NADP 0,5mM, Cysteinchlorid 10mM, AMP 2mM, G1,6P 0,2mM, G6PDH 2,5 μ g, PGM 5 μ g, pH 7,6.

Fructose-6-phospho-Kinase:

TRA 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 8 mM,
KCl 200 mM, NADH 0,2 mM, ATP 2 mM,
KCN 0,03 mM, Aldolase 50/ μg , TIM
10/ μg , GDH 1/ μg , F6P 2 mM, pH 7,6.
Hexokinase:
TRA 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 8 mM,
NADP 1 mM, Glucose 2 mM, G6PDH
5/ μg , ATP 2 mM, pH 7,6.

Die Glycogensynthetase wurde bestimmt nach L e l o i r und G o l d e m b e r g (17) mit einigen Modifikationen. Verdünnung Gewebe/Homogenisat 1:10 - 1:30. 50 μl Homogenisat und 450 μl Substrat (Tris 50 mM, UDPG 9,5 mM, EDTA 5 mM, Na_2SO_3 20 mM, G6P 10 mM, Glykogen 1 %, pH 8,2) werden für 14 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird abgestoppt durch Erhitzen in heißem Wasser. Das entstandene UDP wird gemessen (TRA 50 mM, EDTA 5 mM, MgSO_4 8 mM, KCl 75 mM, NADH 0,2 mM, PEP 0,8 mM, LDH 25 μg , PK 10 μg). Das Enzym wird mit und ohne G6P gemessen.

Die Phosphorylase wird bestimmt nach C o r r i in einer Modifikation von Hers (12). Das Substrat enthält G1P 0,1 M, Glykogen 2%, AMP 0,003 M, NaF 0,2 M, pH 6,1. 100 μl Homogenisat und 100 μl Substrat werden bei 37°C inkubiert. Nach 20 und 40 min wird die Reaktion durch 10%ige TCA abgestoppt. Ein Blindwert läuft parallel. Der Phosphor wird bestimmt nach F i s k e und S u b b a r o w (9) in einer Test-Kombination von Merck, Darmstadt.

Die Glucose-6-phosphatase wird gemessen nach der Methode von Hers (12). Gleichzeitig wird die Aktivität anderer Phosphatasen, die Inaktivierung bei pH 5 und die Inkubation mit β -Glycerophosphat bestimmt. Ein Gemisch von 0,1 ml G6P 0,1 M oder 0,1 ml beta-glycero-phosphat 0,1 M (jedes pH 6,5) und 0,1 ml Leberhomogenisat werden bei 37°C für 60 min inkubiert. Ein anderes Homogenisat (0,1 ml) wird präinkubiert bei 37°C für 5 min in 0,01 ml Acetatpuffer 0,1 M, pH 5,0. Dann werden 0,1 ml G6P zugegeben und wie oben gemessen. Die Reaktion wird mit 10%iger TCA gestoppt. Der Phosphor wird bestimmt. Die Differenz in der Aktivität zwischen den Ergebnissen mit G6P und β -Glycerophosphat und denen vor und nach Inaktivierung bei pH 5,0 ist die

spezifische Aktivität der G6Pase.

Die α -Glucosidase wird nach der Methode von H e r s (11) bestimmt. 100 μ l Homogenisat werden mit 100 μ l Na-Acetat-Puffer 50 mM pH 4,0 und 50 μ l Maltose 10 mg/ml bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Ein Blindwert läuft parallel. Die Reaktion wird abgestoppt mit 0,3-molarer PCA in einer Verdünnung von 1:10. Glucose wird bestimmt mit HK und G6PDH.

Die Amylo-1,6-Glucosidase wurde nach der Methode von H e r s (11) bestimmt. Lebergewebe wird 1:100 mit H₂O verdünnt und mit dem Sonifier homogenisiert. 100 μ l Homogenisat werden mit Phosphorylase-Grenz-Dextrin (PLD) 2%ig in Histidinchlorid 0,1M und EDTA 0,005 M pH 6,5 100 μ l 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Enteiweißung mit PCA wird Glucose mit HK und G-6-PDH gemessen. Zur Herstellung von PLD werden AMP (78 mg), Phosphorylase b (5 mg) und Glykogen 300 mg in 10 ml Na₂HPO₄-Puffer 0,4 M pH 6,5 gelöst und 12 Stunden gegen den selben Puffer dialysiert. Alle 4 Stunden wird gewechselt. Das Dialysat wird mit 0,5 g TCA enteiweißt und zentrifugiert. PLD wird mit 70%igem Äthanol ausgefällt und 3 mal mit Äthanol gewaschen. Das letzte Präzipitat wird in 10 ml H₂O aufgenommen und 6 Stunden gegen H₂O dialysiert. PLD wird wieder mit Äthanol ausgefällt. Der Überstand wird dekantiert und das Sediment getrocknet.

Statistische Berechnung:

Zur statistischen Berechnung diente der zweiseitige Signifikanztest nach Man und Whitney (19). Sein Anwendungsbereich ist gegeben beim Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen von Werten, innerhalb derer keine Normalverteilung der einzelnen Werte entsprechend der Gauß'schen Kurve vorhanden ist.

Dazu werden acht Altersgruppen gebildet, die 2, 4 oder 6 Tage umfassen. In jeder Gruppe sind mindestens sieben Meßwerte enthalten.

Altersgruppe	1	:	16.-17.	Fötaltag
"	"	2	:	18.-19. "
"	"	3	:	20.-21. "
"	"	4	:	22.-23. "
"	"	5	:	1.-4. Lebenstag
"	"	6	:	5.-8. "
"	"	7	:	9.-14. "
"	"	8	:	15.-20. "

Jede Altersgruppe oder Stichprobe von Phenobarbital-behandelten Tieren wird mit der der Kontrolltiere verglichen, wobei die Werte zu einer gemeinsamen Reihe zusammengefaßt werden und ihrer Größe nach geordnet eine Rangzahl erhalten. Unterscheiden sich die Summen der Rangzahlen beider Gruppen, wird U bzw. U' entsprechen der Gleichung:

$$U = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1(n_2 + 1)}{2} - R_1 \quad \text{bzw.}$$

$$U' = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2 \quad \text{ermittelt,}$$

wobei n_1 der Anzahl der Werte der Phenobarbitalgruppe,

n_2 " " " " " Kontrollgruppe,

R_1 der Summe der Rangzahlen der Phenobarbitalgruppe und

R_2 " " " " " Kontrollgruppe entspricht.

Der kleinere der beiden Werte U und U' wird gewählt, und die Signifikanz anhand der Tafel für das Gauß'sche Integral beurteilt, wobei im zweiseitigen Test, der eine Abweichung der unter Phenobarbitaleinfluß gemessenen Werte von den Kontrollmeßwerten nach oben und nach unten prüft, $\alpha = 0,05 = 5\%$ angenommen wird.

Ergebnisse

Die Phosphoglucomutase (Tab. 1 Seite 17) zeigt während der Ontogenese vom 16. Fötaltag bis zum 4. Lebenstag eine Aktivitätszunahme um das 3,5-fache und bleibt dann bis zum Ende des untersuchten Zeitabschnitts am 20. Lebenstag konstant.

Durch Phenobarbital wird sie nicht beeinflusst.

Die Phosphoglucoisomerase (Tab. 2 Seite 18) zeigt während der Ontogenese vom 16. Fötal- bis zum 20. Lebenstag keine wesentlichen Aktivitätsveränderungen.

Durch Phenobarbital wird sie nicht beeinflusst.

Die Hexokinase (Tab. 3 Seite 18) zeigt während der Ontogenese pränatal vom 16. bis zum 23. Fötaltag eine Aktivitätszunahme um insgesamt ein Fünftel; auffallend ist eine niedrigere Aktivität am 20. und 21. Fötaltag, die unter der liegt, die am 16. und 17. Fötaltag gemessen wurde. Postnatal kommt es vom 1. bis zum 20. Lebenstag zu einem Aktivitätsabfall auf ein Drittel der am 16. und 17. Fötaltag gemessenen Aktivität.

Unter Phenobarbital zeigt sich als einziger signifikanter Unterschied gegenüber den Untersuchungsergebnissen von Kontrolltieren eine Erhöhung um 23 % in Gruppe 1. In den Gruppen 2 bis 8 ist kein Effekt festzustellen.

Die Fructose-6-Phosphat-Kinase (Tab. 4 Seite 19) zeigt während der Ontogenese vom 16. Fötal- bis zum 4. Lebenstag eine Aktivitätszunahme um das 1,5-fache. Vom 5. bis zum 20. Lebenstag kommt es zu einem Aktivitätsabfall auf Werte, die wenig über denen der am 16. und 17. Fötaltag gemessenen Aktivität liegen. Ob diese perinatale Aktivitätsveränderungen ontogenetisch bedingt sind oder durch die Streubreite der Meßergebnisse hervorgerufen sind ist fraglich; letztes ist wahrscheinlich. Unter Phenobarbital ist in der Fetalperiode und postnatal bis zum 8. Lebenstag eine verminderte Aktivität zu beobachten, statistisch allerdings nicht signifikant in den Gruppen 2 und 5. Vom 9. bis zum 20. Lebenstag ist kein Unterschied gegenüber den Meßwerten von Kontrolltieren vorhanden.

Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Tab. 5 Seite 18) zeigt

während der Ontogenese pränatal eine nahezu konstante Aktivität; nur in Gruppe 3 (20. und 21. Fötaltag) ist sie etwas niedriger als in den drei übrigen Gruppen vor der Geburt. Nach der Geburt sinkt sie vom 1. bis zum 20. Lebenstag kontinuierlich ab auf nahezu die Hälfte der pränatal gemessenen Aktivität. Unter Phenobarbital wird sie pränatal und postnatal vom 16. Fötal- bis zum 20. Lebenstag gesenkt, die statistische Signifikanz ist allerdings in den Gruppen 1, 2, 4 und 6 nicht gegeben.

Die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Tab. 6 Seite 20) zeigt während der Ontogenese pränatal eine nahezu konstante Aktivität, nur in Gruppe 3 (20. und 21. Fötaltag) steigt sie um ein Zehntel der in den übrigen Gruppen pränatal gemessenen Aktivität an, Postnatal fällt sie vom 1. bis zum 20. Lebenstag auf die Hälfte der am 16. und 17. Fötaltag gemessenen Aktivität ab. Unter Phenobarbital wird sie pränatal in den ersten drei Gruppen erniedrigt, in den Gruppen 4, 5, 6, 7 und 8 bleibt sie unverändert.

Bei der Phosphorylase handelt es sich um ein sehr empfindliches Enzym, das in einem komplizierten System aktiviert und inaktiviert wird. Zur Sicherung der Ergebnisse wurde sie deshalb durch zwei verschiedene Methoden bestimmt: durch Glucose-1-Phosphat-Abspaltung im optischen Test (Tab. 7 Seite 20) und durch Phosphatfreisetzung (Tab. 8 Seite 21 Abb. 1 Seite 25). Bei diesen beiden Methoden verhalten sich die Aktivitäten wie 1:10, d.h. die im optischen Test gefundene Aktivität ist 10mal geringer als die durch Phosphatbestimmung erhaltene. Das ontogenetische Verhalten des Enzyms ist bei beiden Methoden nahezu identisch. Der Anstieg vom 16. Fötal- bis zum 4. Lebenstag ist etwa 2-fach. Die Aktivität bleibt dann bis zum 20. Lebenstag etwa gleich. Unter Phenobarbital ist mit beiden Meßmethoden pränatal in den Gruppen 1, 2 und 3 keine Veränderung festzustellen, im optischen Test zeigt sich in Gruppe 4 eine signifikante Erniedrigung um 62 %. Postnatal ist mit beiden Meßmethoden eine Aktivitätsminderung zu beobachten, im optischen Test in den Gruppen 6 und 7 um 21% bzw. 15%, bei der Methode mit Phosphatabspaltung in allen vier Gruppen nach der Geburt um 30-40%.

Die Fructose-1,6-diphosphatase (Tab. 9 Seite 21, Abb. 2 Seite 26) zeigt während der Ontogenese pränatal eine geringe Aktivität. Innerhalb der ersten vier Lebenstage wächst sie um das 6-fache an, erhöht sich auch vom 5. bis 8. Lebenstag, jedoch nur leicht und fällt dann bis zum 20. Lebenstag wieder ab auf Werte, wie sie in den ersten vier Tagen postnatal gemessen wurden. Phenobarbital hat einen deutlichen Effekt auf dieses Enzym. Postnatal ist vom 1. bis zum 20. Lebenstag eine signifikante Erniedrigung der Aktivität zu beobachten. Pränatal ist lediglich in Gruppe 2 eine Erhöhung um das 2,5-fache vorhanden, die Gruppen 1, 3 und 4 bleiben unverändert.

Die Glucose-6-Phosphatase (Tab. 10 Seite 22) zeigt während der Ontogenese pränatal eine geringe Aktivität, in Gruppe 1 (16. und 17. Fötaltag) war bei den meisten Tieren keinerlei Aktivität meßbar und erst in Gruppe 2 konnte eine Aktivität gefunden werden, die bis zur Geburt auf das 10-fache ansteigt. Unmittelbar nach der Geburt, in Gruppe 5, kommt es zu einem Aktivitätsanstieg um das 40-fache der höchsten pränatal gemessenen Werte. Nach einem geringen Abfall bleibt die Aktivität bis zum 20. Lebenstag nahezu konstant.

Unter Phenobarbital zeigt dieses Enzym prozentual die stärkste Abweichung von den Werten der Kontrolltiere, nämlich vor Geburt eine Erhöhung in Gruppe 3 und 4 um 480% bzw. 560%. Postnatal ist kein einheitlicher Effekt vorhanden; in den Gruppen 6 und 8 wird die Aktivität verdoppelt, in Gruppe 7 zeigt sich eine Erniedrigung um 25%, hier kann ein methodischer Fehler angenommen werden. Unbeeinflusst bleibt das Enzym in den Gruppen 2 und 5.

Die Amylo-1,6-Glucosidase (Tab. 11 Seite 22, Abb. 3 Seite 26) zeigt während der Ontogenese pränatal und postnatal einen stetigen Anstieg. Um die Geburt verdoppelt sich die Aktivität. Unter Phenobarbital bleibt sie in den Gruppen 1 bis 4 unbeeinflusst, nach der Geburt wird sie in allen Gruppen erniedrigt, um maximal 30% in Gruppe 5 und 8.

Die α -Glucosidase (Tab. 12 Seite 23) zeigt während der Ontogenese vom 16. Fötal- bis zum 4. Lebenstag eine Aktivitätszu-

nahme um das 3-fache; auffallend ist eine vorübergehend hohe Aktivität am 20. und 21. Fötaltag. Postnatal sinkt sie vom 5. bis 8. Lebenstag ab und bleibt dann bis zum 20. Lebenstag nahezu konstant.

Unter Phenobarbital ist pränatal in den Gruppen 2, 3 und 4 ein Anstieg um 80% zu beobachten, postnatal lediglich in Gruppe 7 um 10%. Kein Einfluß von Phenobarbital ist in den Gruppen 1, 5, 6 und 8 festzustellen.

Die Glykogensynthetase wurde als Gesamtzym mit G6P und als a-Form ohne G6P bestimmt. Das Gesamtzym (Tab. 13 Seite 23, Abb. 4 Seite 27) zeigt während der Ontogenese pränatal einen sprunghaften Aktivitätsanstieg um das 4-fache in Gruppe 3, steigt dann bis zum 4. Lebenstag weiterhin an und fällt vom 5. bis zum 20. Lebenstag auf nahezu die Hälfte der Aktivität ab, die in Gruppe 5 gemessen wurde.

Unter Phenobarbital wurde pränatal eine Zunahme der Aktivität in den Gruppen 3 und 4 um 52% bzw. 65% beobachtet. Postnatal wird die Aktivität in den Gruppen 7 und 8 um 22% bzw. 14% gesenkt. Kein Effekt ist in den Gruppen 1, 2, 5 und 6 festzustellen.

Die a-Form der Glykogensynthetase (Tab. 14 Seite 24, Abb. 5 Seite 27) zeigt während der Ontogenese vom 16. Fötal- bis zum 20. Lebenstag eine stetige Aktivitätszunahme.

Unter Phenobarbital kommt es pränatal zu einem enormen Aktivitätsanstieg in Gruppe 3 um 168% und in Gruppe 4 um 195%. Der normalerweise postnatal zu beobachtende Aktivitätsanstieg wird durch Phenobarbital verhindert, und es findet von Gruppe 6 bis 8 eine zunehmende Aktivitätsminderung statt um 35%, 52% und 72% gegenüber den Kontrollversuchen. Kein Effekt ist in den Gruppen 1, 2 und 5 festzustellen.

Der Proteingehalt der Leber (Tab. 15 Seite 24) ist während der Ontogenese vor der Geburt ziemlich konstant. In den ersten vier Lebenstagen nimmt er um das 1,5-fache zu und bleibt dann wieder nahezu konstant.

Unter Phenobarbital ist im ganzen untersuchten Altersabschnitt der Fetal- und Neugeborenenperiode der Proteingehalt im Vergleich zu den Ergebnissen, die bei Kontrolltieren gefunden wurden, erhöht.

Erläuterung zu den Tabellen 1 bis 15,
Seite 17-24

Tab. 1 Phosphoglucomutase

<u>Gruppe:</u>	1	: 16.-17. Fötaltag	Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz
2	:	18.-19. "				
3	:	20.-21. "	1	24.0 22.0	26.4 24.2	-
4	:	22.-23. "		27.7	28.7	
5	:	1.-4. Lebenstag	2	39.8 34.2	48.8 45.5	-
6	:	5.-8. "		43.5	52.1	
7	:	9.-14. "	3	68.6 63.9	65.5 54.7	-
8	:	15.-20. "		79.3	67.4	
<u>Kontrolle:</u> unbehandelte Tiere, bzw. NaCl 0,9% injiziert.						
<u>Phenobarbital:</u> Behandlung an drei auf- einanderfolgenden Tagen mit einer Dosis von 80 mg/ kg KG bezogen auf die trächtige bzw. junge Ratte.						
Signifikanz: Test nach Man und Whitney (19)						
<u>Werte:</u> Median- und 30 Perzentilgrenzwerte der Gesamtzahl aller gemessenen Werte einer Altersgruppe.						
			7	90.3 87.2	87.0 83.8	-
			8	91.0 85.6	82.7 69.4	-
				95.4	99.0	

Tab. 6	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase				Tab. 7	Phosphorylase (opt. Test)		
Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz		Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz
1	2.86 2.81 2.97	2.33 2.32 2.34	+		1	0.74 0.57 1.12	0.50 0.45 0.55	-
2	2.88 2.59 3.10	2.41 2.28 2.42	+		2	0.75 0.67 0.88	1.02 1.00 1.04	-
3	3.13 3.03 3.15	2.04 1.89 2.27	+		3	1.07 1.05 1.13	1.02 1.01 1.26	-
4	2.87 2.36 3.03	2.50 2.22 3.03	-		4	1.63 1.51 1.86	0.68 0.59 0.89	+
5	2.23 2.10 2.43	2.26 2.23 2.39	-		5	1.54 1.51 1.81	1.57 1.50 1.73	-
6	1.55 1.53 1.68	1.87 1.78 1.89	-		6	1.71 1.51 1.97	1.35 1.10 1.57	+
7	1.52 1.52 1.70	1.83 1.82 1.85	-		7	1.61 1.51 1.89	1.38 0.85 1.76	+
8	1.48 1.41 1.57	1.38 1.28 1.44	-		8	1.11 0.91 1.21	1.32 1.10 1.62	-

Phosphorylase				Fructose-1,6-disphosphatase					
Tab. 8	Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz	Tab. 9	Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz
	1	6.32 4.92 6.60	4.44 4.12 5.59	-		1	0.27 0.23 0.29	0.25 0.25 0.26	-
	2	7.78 5.98 9.36	8.65 7.25 9.25	-		2	0.24 0.23 0.26	0.62 0.32 0.91	+
	3	11.56 10.87 14.87	14.07 10.25 16.65	-		3	0.52 0.43 0.53	0.43 0.29 1.17	-
	4	13.10 12.67 13.68	16.17 13.47 16.90	-		4	1.26 1.26 1.51	1.45 1.22 1.51	-
	5	22.30 17.77 23.43	15.37 13.50 19.60	+		5	6.06 5.62 7.20	4.80 4.35 5.05	+
	6	20.15 17.60 22.65	11.35 10.85 11.75	+		6	8.34 7.95 8.49	5.62 5.61 5.87	+
	7	19.34 18.10 22.20	15.80 12.70 17.05	+		7	7.56 7.18 7.59	5.47 5.30 7.05	+
	8	19.40 17.75 23.50	15.52 15.40 15.80	+		8	6.51 6.44 6.83	5.28 5.00 5.40	+

Glucose-6-phosphatase				Amylo-1,6-Glucosidase			
Tab. 10				Tab. 11			
Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz	Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz
1	0.00 0.04	0.12 0.19	+	1	0.07 0.11	0.15 0.12 0.16	-
2	0.25 0.33	0.59 0.46 0.73	-	2	0.15 0.13 0.17	0.21 0.20 0.25	-
3	0.34 0.31 0.38	1.79 1.59 3.38	+	3	0.36 0.24 0.45	0.45 0.40 0.50	-
4	0.50 0.46 1.91	3.31 2.49 3.98	+	4	0.43 0.38 0.53	0.53 0.48 0.56	-
5	21.10 17.70 22.40	18.70 15.50 20.50	-	5	0.89 0.87 0.93	0.62 0.59 0.75	+
6	10.40 10.20 17.82	20.60 20.30 21.05	+	6	0.95 0.93 1.06	0.75 0.69 0.78	+
7	18.90 17.00 22.40	15.77 14.95 16.30	+	7	1.15 1.10 1.19	0.91 0.85 0.99	+
8	13.30 12.65 13.90	26.10 15.60 29.50	+	8	1.22 1.14 1.36	0.85 0.78 0.92	+

Tab. 12	α -Glucosidase				Tab. 13	Glykogensynthetase (gesamt)			
Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz		Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz	
1	0.11 0.08 0.12	0.16 0.13 0.17	-		1	0.70 0.65 0.92	0.50 0.44 0.55	+	
2	0.16 0.13 0.18	0.24 0.24 0.25	+		2	0.71 0.64 1.04	1.78 1.51 2.03	-	
3	0.22 0.18 0.24	0.33 0.31 0.35	+		3	2.58 2.39 2.80	3.94 3.59 4.25	+	
4	0.17 0.16 0.22	0.31 0.30 0.35	+		4	2.72 2.59 2.73	4.49 4.09 4.89	+	
5	0.47 0.38 0.49	0.41 0.37 0.50	-		5	3.96 2.74 4.66	2.82 2.40 3.40	-	
6	0.35 0.33 0.56	0.48 0.44 0.52	-		6	3.14 2.42 3.70	2.24 2.12 2.31	-	
7	0.45 0.38 0.47	0.50 0.48 0.53	+		7	2.28 1.94 2.78	1.78 1.55 2.28	+	
8	0.38 0.34 0.47	0.48 0.39 0.51	-		8	2.11 2.09 2.49	1.80 1.62 1.83	+	

Tab. 10	Glucose-6-phosphatase				Tab. 11	Amylo-1,6-Glucosidase			
Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz		Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz	
1	0.00	0.12	0.00	+	1	0.07	0.15	0.12	-
	0.00	0.04	0.19			0.03	0.11	0.16	
2	0.25	0.59	0.46	-	2	0.15	0.21	0.20	-
	0.33	0.73	0.73			0.17	0.25	0.25	
3	0.34	1.79	1.59	+	3	0.36	0.45	0.40	-
	0.38	3.38	3.38			0.24	0.50	0.50	
4	0.50	3.31	2.49	+	4	0.43	0.53	0.48	-
	1.91	3.98	3.98			0.38	0.56	0.56	
5	21.10	18.70	15.50	-	5	0.89	0.62	0.59	+
	22.40	20.50	20.50			0.87	0.75	0.75	
6	10.40	20.60	20.30	+	6	0.95	0.75	0.69	+
	17.82	21.05	21.05			0.93	0.78	0.78	
7	18.90	15.77	14.95	+	7	1.15	0.91	0.85	+
	22.40	16.30	16.30			1.10	0.99	0.99	
8	13.30	26.10	15.60	+	8	1.22	0.85	0.78	+
	12.65	29.50	29.50			1.14	0.92	0.92	

Tab. 12				X -Glucosidase				Tab. 13				Glykogensynthetase (gesamt)			
Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz	Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz	Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz	Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz
1	0.11 0.08 0.12	0.16 0.13 0.17	-	1	0.70 0.65 0.92	0.50 0.44 0.55	+	2	0.71 0.64 1.04	1.78 1.51 2.03	-	3	2.58 2.39 2.80	3.94 3.59 4.25	+
2	0.16 0.13 0.18	0.24 0.24 0.25	+	2				4	2.72 2.59 2.73	4.49 4.09 4.89	+	5	3.96 2.74 4.66	2.82 2.40 3.40	-
3	0.22 0.18 0.24	0.33 0.31 0.35	+	3				6	3.14 2.42 3.70	2.24 2.12 2.31	-	7	2.28 1.94 2.78	1.78 1.55 2.28	+
4	0.17 0.16 0.22	0.31 0.30 0.35	+	4				8	2.11 2.09 2.49	1.80 1.62 1.83	+	8			
5	0.47 0.38 0.49	0.41 0.37 0.50	-	5											
6	0.35 0.33 0.56	0.48 0.44 0.52	-	6											
7	0.45 0.38 0.47	0.50 0.48 0.53	+	7											
8	0.38 0.34 0.47	0.48 0.39 0.51	-	8											

Tab. 14 Glykogensynthetase (a-Form)

Alters- gruppe	Kontrolle	Pheno- barbital	Signi- fikanz	Alters- gruppe	Protein	Pheno- barbital	Signi- fikanz
1	0.09 0.05 0.13	0.05 0.05 0.08	-	1	77.0 76.0 77.0	92.0 85.0 107.0	+
2	0.13 0.06 0.14	0.27 0.08 0.33	-	2	79.0 77.0 80.0	104.0 103.0 110.0	+
3	0.18 0.22 0.38	0.48 0.42 0.62	+	3	75.0 72.0 78.0	100.0 99.0 105.0	+
4	0.35 0.20 0.44	0.94 0.88 1.11	+	4	81.0 77.0 87.0	97.0 92.0 108.0	+
5	0.44 0.33 0.66	0.50 0.44 0.55	-	5	117.0 112.0 120.0	131.0 126.0 135.0	+
6	0.66 0.60 0.68	0.43 0.24 0.46	+	6	117.0 114.0 121.0	138.0 135.0 140.0	+
7	0.68 0.60 0.77	0.33 0.27 0.40	+	7	125.0 124.0 131.0	146.0 143.0 149.0	+
8	0.80 0.69 0.87	0.23 0.22 0.27	+	8	125.0 115.0 130.0	127.0 123.0 133.0	+

Abbildungen

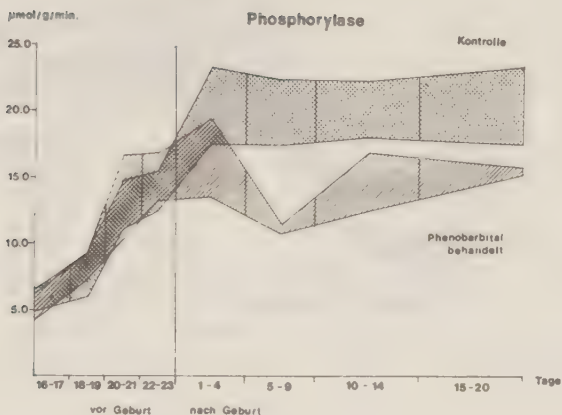


Abb. 1

Erläuterung zu den Abbildungen 1 bis 5, Seite 25-27

Enzymaktivität gemessen in $\mu\text{mol/gr. Leber/Min.}$

Kontrolle: unbehandelte Tiere

Phenobarbital: Dosierung an drei aufeinanderfolgenden Tagen
80 mg/kg KG bezogen auf die trächtige bzw. junge Ratte.

Der Zeitpunkt der Geburt ist durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet.

Senkrechte Linien im Flächenbereich grenzen die Altersgruppen ab. Die schraffierten und punktierten Flächen ergeben sich aus der Verbindung der oberen bzw. unteren Grenzwerte jeder Altersgruppe (s. dazugehörige Tabellen Seite 17 bis Seite 24).

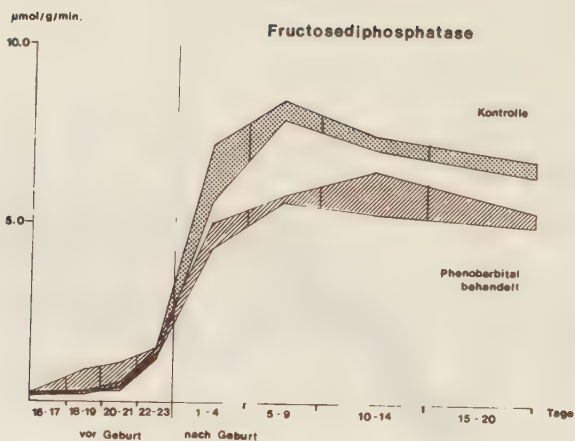


Abb. 2

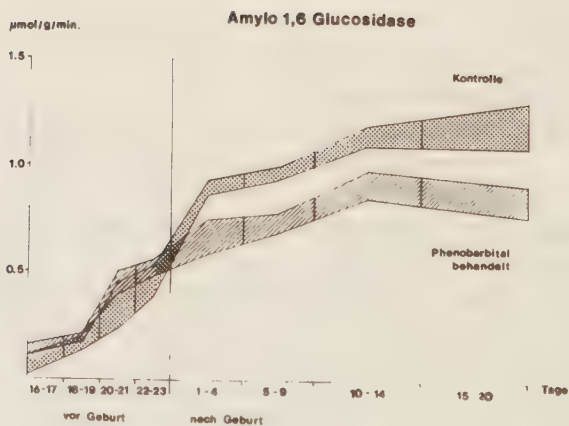


Abb. 3

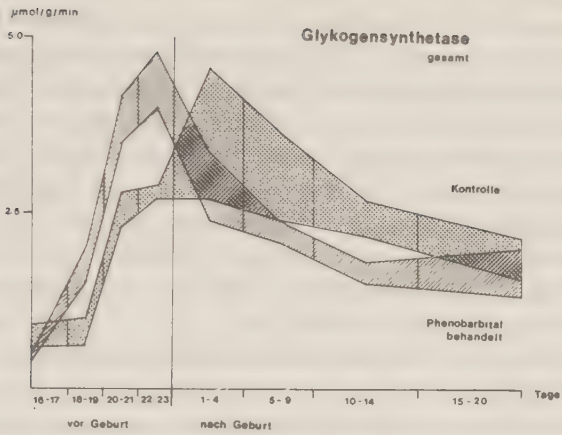


Abb. 4

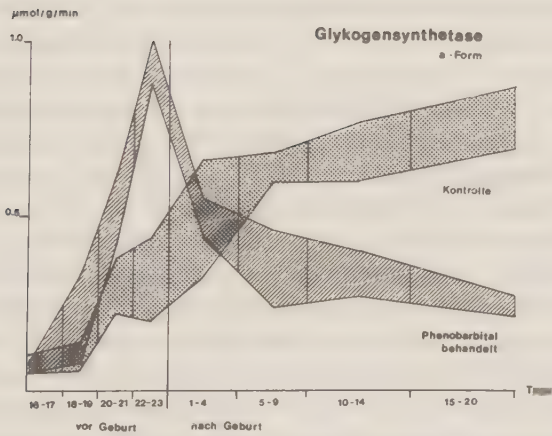


Abb. 5

Diskussion

Untersuchungen mit Phenobarbital wurden vielfach durchgeführt im Zusammenhang mit der Induzierbarkeit von Enzymen, die intrazellulär an zytoplasmatische Membranen gebunden, chemisch in der Mikrosomenfraktion nachzuweisen sind und als unspezifische Oxydasen, Reduktasen, Esterasen, Hydroxylasen, N- oder O-De-methylasen den Abbau sehr verschiedener, vorwiegend körperfremder Substanzen katalysieren (8, 10, 15, 20, 24, 25).

Phenobarbital wird im Menschen zu 80% in der Leber mit Hilfe einiger dieser Enzyme metabolisiert, 20% werden unverändert durch die Niere ausgeschieden (24).

Bei Erstapplikation von Phenobarbital an Ratten erfolgt nach einer Latenzphase von 12 bis 24 Stunden eine Steigerung der Aktivität medikamenteabbauender Enzyme, die ihren Ausdruck findet im beschleunigten Abbau einer weiteren Dosis desselben Medikaments, aber auch völlig anderer Substanzen wie Benzpyrene und Azofarbstoffe. Gemeinsam ist diesen Substraten bei verschiedener chemischer Struktur eine gute Lipidlöslichkeit, was ein Eindringen in die Zelle ermöglicht. Die elektronenmikroskopisch zu beobachtende Zunahme zytoplasmatischer Membranen, vorwiegend des glatten endoplasmatischen Retikulums könnte der Grund der Enzymvermehrung sein.

Es zeigt sich, daß andere, nicht am Medikamentenabbau beteiligte, aber ebenfalls mikrosomale Enzyme sich unter Phenobarbitaleinfluß unterschiedlich verhalten und teils aktiviert (NADPH-abhängige Cytochrom c-Reduktase (15)), teils inhibiert (NADH-abhängige Cytochrom c-Reduktase (15) (20) oder überhaupt nicht beeinflußt werden (NADPH-Oxydase (20)).

Die G6Pase ist als einziges mikrosomales Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels am ER lokalisiert und hier in der Fraktion des glatten und des rauhen ER nachzuweisen (20). Ihr Verhalten im Zusammenhang mit der Zunahme zytoplasmatischer Membranen nach Phenobarbitalapplikation wurde von Platt (21) und Orr et al. (20) an erwachsenen Ratten untersucht: sie fanden die Aktivität der G6Pase um 33% bzw. 50% vermindert, während Remmer sie im Kaninchenversuch erhöhen konnte (24). Das Medikament wurde oral 14 Tage lang mit einer Dosis von 200 mg/kg KG (21) oder

3 Tage (20) bzw. 8 Tage lang (24) mit einer täglichen Dosis von 50 bis 90 mg/kg KG appliziert. In unseren Untersuchungen wurde das Enzym vor Geburt stimuliert, nach Geburt erhielten wir unterschiedliche Effekte (Tab. 9 Seite 21), die sich nicht deuten lassen. Vielleicht lassen sich die bei den verschiedenen Autoren abweichenden Ergebnisse dadurch erklären, daß das Bezugssystem nicht einheitlich ist: P l a t t und O r r e n i u s bezogen ihre Messergebnisse auf den Proteingehalt der Leber oder einer Zellfraktion, R e m m e r und auch wir dagegen auf das Leberfeuchtgewicht. Verändert sich der Proteingehalt - nach Untersuchungen dieser Autoren und auch nach unseren nimmt er unter der Phenobarbitalbehandlung zu - kann eine auf das Lebergewicht bezogene Aktivitätssteigerung nach Umrechnung auf den Proteingehalt sich verringern oder sogar zu einer Aktivitätsminderung werden, ohne daß über eine quantitative Änderung des Enzymproteins etwas ausgesagt werden kann. Denn es ist nicht bekannt, welche Zellproteine unter Phenobarbital zunehmen - Struktur - oder Enzymproteine oder beides (dazu müßte man sämtliche aus einer bestimmten Fraktion zu erhaltenden Enzymaktivitäten zum Proteingehalt dieser Fraktion in Beziehung setzen). R e m m e r konnte jedoch beweisen, daß es sich bei der Phenobarbitalinduktion im Falle der Azofarbstoffdemethylase um eine Enzymsynthese de novo handelt, da der Induktionseffekt durch Antimetaboliten des Nukleinsäurestoffwechsels verhindert wurde (24).

In der pränatalen Periode ergab sich bei der Glucose-6-phosphatase ein interessanter Befund, da bei den jüngsten Föten, also in Gruppe 1 Phenobarbital die Aktivierung eines eigentlich noch gar nicht vorhandenen Enzyms bewirkt. Man könnte annehmen, daß der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens eines Enzyms genetisch determiniert ist und nur durch körpereigene Substanzen wie z.B. Hormone beeinflußt werden kann; dazu sind Versuche von J a m d a r und G r e e n g a r d (13) aufschlußreich, die zeigen, daß durch Hydrocortison bei gleichzeitiger Glucosegabe die Erstaktivierung der Glucokinase, eines Isoenzym der von uns untersuchten Hexokinase, das diese in der Neugeborenenperiode ablöst, um 1 Woche vorverlegt wird.

Ob Phenobarbital auf Hormone wirkt, ist fraglich. Eine Hormon-

abhängigkeit der Wirkung vermutet R e m m e r, da er verschiedene Ergebnisse von männlichen und weiblichen Ratten erhielt (23).

Auffallend ist die gegensinnige Beeinflußbarkeit der Glykogensynthetase vor und nach der Geburt, und vielleicht ist auch sie auf unterschiedliche Hormonverhältnisse intra- und extrauterin zurückzuführen. Während vor der Geburt die Aktivität zunimmt, sinkt sie nach der Geburt ab. Betrachtet man das Verhältnis von a-Form zum Gesamtzym, so zeigt sich, daß pränatal die a-Form gegenüber dem Gesamtzym mehr zunimmt, postnatal mehr abnimmt. Daraus könnte man schließen, daß die inaktive b-Form in die aktive a-Form umgewandelt wird und umgekehrt. S c h a u b fand bei fötalen und neugeborenen Ratten nach Glucagoninjektion eine Abnahme der a-Form zugunsten der b-Form (28).

Die verminderte Synthetaseaktivität postnatal könnte zu den Ergebnissen von J a p u n d Ć i ć (14) passen, der eine Glykogenabnahme unter Phenobarbital beobachtete; zugleich sind in unseren Versuchen auch die Aktivitäten der beiden glykogenolytischen Enzyme Amylo-1,6-Glucosidase und Phosphorylase gesenkt, was für einen insgesamt erniedrigten Glykogenstoffwechsel spricht.

Ganz anders sind die Verhältnisse nach Phenobarbitaleinfluß pränatal. Hier wäre aufgrund der hohen Synthetaseaktivität ein vermehrter Glykogenegehalt der Leber zu erwarten - Messungen darüber liegen leider noch nicht vor. Auf Veränderungen im Glykogenabbau finden sich pränatal wenige Hinweise. Die glykogenolytischen Enzyme bleiben mit Ausnahme der lysosomalen α -Glucosidase, die aktiviert wird, unverändert.

Die Untersuchungsergebnisse der übrigen löslichen Enzyme lassen keine Deutung zu, ob ein bestimmter Stoffwechselweg bevorzugt wird oder nicht und sind teilweise nicht in Einklang zu bringen mit Befunden an erwachsenen Ratten aus der Literatur: die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase fand B r e s n i c k (4) um 100% nach 4maliger Applikation mit einer täglichen Dosis von 80 mg/kg KG gesteigert, P l a t t (21) nach 2wöchiger oraler Applikation um 30%. B r e s n i c k wählte ein pH von 9,0, P l a t t ein pH von 7,6. In unseren Versuchen erfolgte die Messung eben-

falls bei pH 7,6; es zeigte sich pränatal eine Hemmung des Enzyms.

Eine andere Oxydase des Pentosephosphatzzyklus ist die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. B r e s n i c k und P l a t t fanden ihre Aktivität bei gleicher Applikationsform und -dauer wie oben angeführt um 100% bzw. 61% gesteigert; in unseren Versuchen zeigte sich eine Hemmung oder Nichtbeeinflussung durch Phenobarbital.

Wie weit die Verhältnisse, wie wir sie in der Rattenleber finden, auf die menschliche Leber übertragbar sind, bleibt fraglich. Wird durch Phenobarbital die G6Pase in der unreifen menschlichen Leber ebenso gesteigert wie das bei der Rattenleber der Fall ist, wäre eine Glucosefreisetzung ins Blut, ein Blutzuckeranstieg und damit eine günstige Beeinflussung der Hypoglykämie neigung Frühgeborener und untergewichtiger neugeborener Kinder zu erwarten. Blutzuckerbestimmungen unter der Wirkung von Phenobarbital könnten darüber Aufschluß geben.

Zusammenfassung

Die Untersuchung von zwölf Enzymen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels und die Proteinbestimmung in der Leber fötaler und neugeborener Ratten nach dreitägiger Phenobarbitalbehandlung ergab:

Phenobarbital beeinflusst die Aktivität einiger Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels. Eine Inhibition ist bei den Enzymen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Phosphorylase, Fruktose-1,6-Diphosphatase, Amylo-1,6-Glucosidase, Glykogensynthetase zu beobachten, eine Induktion bei den Enzymen Glucose-6-Phosphatase, Glykogensynthetase, α -Glucosidase.

Für die Phenobarbitalwirksamkeit spielen der Reifungsgrad der Leber bzw. intra- und extrauterine Bedingungen eine entscheidende Rolle. Prä- und postnatal ist das Enzymverhalten unter Phenobarbital bei der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Phosphorylase, Fruktose-1,6-Diphosphatase, Amylo-1,6-Glucosidase und Glykogensynthetase unterschiedlich, bei dem zuletzt genannten Enzym ist es sogar gegensinnig.

Eine Erstaktivierung, d.h. eine Vorverlegung des Zeitpunktes, an dem zum ersten Mal eine Enzymaktivität meßbar ist, ist bei der Glucose-6-Phosphatase zu beobachten.

Über die Art der Inhibition und Induktion läßt sich keine Aussage machen, lediglich bei der Glykogensynthetase kann man die Umwandlung einer inaktiven in eine aktive Form des Enzyms bzw. den umgekehrten Vorgang vermuten.

Der Proteingehalt der Rattenleber nimmt unter Phenobarbital in der Fetal- und Neugeborenenperiode zu.

Konsequenzen für die Klinik, im besonderen für eine eventuelle Therapie der Neugeborenenhypoglykämie lassen sich aus dem Tierversuch nicht ohne weiteres ziehen. Der Befund der frühzeitigen und sehr deutlichen Aktivierung der Glucose-6-Phosphatase läßt die Spekulation zu, daß unter der Annahme ähnlicher Verhältnisse in der menschlichen Leber Phenobarbital eine positive Wirkung bei der Neugeborenenhypoglykämie haben könnte, falls die unzureichende Aktivität dieses Enzyms der entscheidende Faktor für die Entstehung dieses Krankheitsbildes ist.

Literatur

- (1) Ballard, F.J., Oliver, J.T.: Glycogenmetabolism in embryonic chick and neonatal rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 71:578 (1963).
- (2) Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Gabade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.: Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphatdehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang.
Z.f.Naturforsch. 8b:555 (1963).
- (3) Bernard, M.C.: De la matière glycogène considérée comme condition de développement de certains tissus, chez le foetus, avant l'apparition de la fonction glycogénique du foie.
Compt. Rend. de Seances de l'academie de sciences:673 (1859).
- (4) Bresnick, E., Yang, H.Y.: The influence of phenobarbital administration upon the "soluble" NADP requiring enzymes in liver.
Biochim. Pharmacol. 13:487 (1964).
- (5) Bücher, Th., Luh, W., Pette, D.: in Hoppe-Seyler-Thierfelder; Handbuch der physiol. und pathol.-chem. Analyse , 10. Aufl..
- (6) Catz, C., Yaffe, S.J.: Pharmacological modification of bilirubin conjugation in the newborn.
Amer. J. Dis. Child. 104:516 (1962).
- (7) Catz, C., Yaffe, S.J.: Barbiturate enhancement of bilirubin conjugation and excretion in young and adult animals.
Ped. Res. 2:361 (1968).

- (8) Conney, A.H., Burns, J.J.: Stimulatory effect of foreign compounds on ascorbic acid biosynthesis and on drug-metabolizing enzymes.
Nature 184:363 (1959).
- (9) Fiske, C.H., Subbarow, J.: The colorimetric determination of phosphorus.
J. Biol. Chem. 66:375 (1925).
- (10) Hart, L.G., Adamson, R.H., Dixon, R.L., Fouts, J.R.: Stimulation of hepatic microsomal drug metabolism in the newborn and fetal rabbit.
J. Pharmacol. Exp. Ther, 137:103 (1962).
- (11) Hers, H.G.: α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease).
Biochem. J. 86:11 (1963).
- (12) Hers, H.G.: Glycogen storage disease.
Adv. Metab. Disorders. 1:1 und 335 (1964).
- (13) Jamdar, S.C., Greengard, O.: Premature formation of glucokinase in developing rat liver.
J. Biol. Chem. 245:2779 (1970).
- (14) Japundžić, J., Japundžić, M., Knežević, B., Mimic-Okry, J.: The influence of phenobarbital on the glycogen concentration of rat liver.
Experientia 25:478 (1969).
- (15) Kasper, Ch.B.: Biochemical distinctions between the nuclear and microsomal membranes from rat hepatocytes. The effect of phenobarbital administration.
J. Biol. Chem. 246:577 (1971).
- (16) Lathe, G.H., Walther, M.: The synthesis of bilirubin glucuronide in animal and human liver.
Biochem. J. 70:707 (1958).
- (17) Leloir, L.F., Goldemberg, S.H.: Synthesis of glycogen from uridine-diphosphat-glucose in liver.
J. Biol. Chem. 235:919 (1960).

- (18) Lüders, D.: Das Für und Wider der Luminalbehandlung von Hyperbilirubinämien.
Z. Kinderheilk. 118:94 (1970).
- (19) Man, H.B., Whitney, D.R.: On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other.
Ann. Math. Statist. 18:50 (1947).
- (20) Orrenius, S., Ericsson, J.L.E.: On the relationship of liver glucose-6-phosphatase to the proliferation of endoplasmic reticulum in phenobarbital induction.
J. Cell. Biol. 31:143 (1966).
- (21) Platt, D.S., Cockrill, B.L.: Liver enlargement and hepatotoxicity: an investigation to the effects of several agents on rat liver enzyme activities.
Biochem. Pharmacol. 16:2257 (1967).
- (22) Porter, K.R., Bruni, C.: An electron microscopy study of the early effect of 3-MeDAB on rat liver cells.
Canc. Res. 19:997 (1959).
- (23) Remmer, H.: Beschleunigung des Evipanabbaus unter der Wirkung von Barbituraten.
Naturwissenschaften 45:189 (1958).
- (24) Remmer, H., Merker, H.J.: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital.
Klin. Wschr. 41:276 (1963).
- (25) Remmer, H.: Die Beschleunigung der Evipanoxydation und der Demethylierung von Methylaminoantipyrin durch Barbiturate.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 237:296 (1970).
- (26) Rogers, L.A., Dixon, R.L., Fouts, J.R.: The effect of SKF 525-A on hepatic glycogen rate of hepatic drug metabolism.
Biochem. Pharmacol. 12:341 (1963).
- (27) Rosen, S.I., Kelley, G.W., Peters, V.B.: Glucose-6-Phosphatase in tubular endoplasmic reticulum of hepatocytes.
Science 152:352 (1966).

- (28) Schaub, J., Becker, I.: The effect of glucagon on the development of glycogenphosphorylase and glycogen synthetase in rat liver.
Biochem. Biophys. Acta 279:398 (1972).
- (29) Schröter, W.: Intrazellulärer Transport und Membran des endoplasmatischen Reticulums der Leberzelle: Neue Aspekte in der Genese der transitorischen Neugeborenenbilirubinämie.
Monatsschr. Kinderheilk. 120,3:119 (1972).
- (30) Villee, C.A.: Enzymes in development of homeostatic mechanisms.
Ciba F.S. on somatic stability in the newborn 246 (1961).
- (31) Whelton, M.J., Parker, D., Black, M., Billing, B.H.: The influence of increased hepatic bilirubin glucuronyl transferase activity on exogenous bilirubin excretion. IV. Meeting of the Europ. Ass. for the study of the liver. Wien (1969).
- (32) Yaffe, S.J., Levy, G., Matsuzawa, T.: Enhancement of glucuronide conjugation capacity in a hyperbilirubinemic infant due to apparent enzyme induction by phenobarbital. J. Pediat. 69:985 (1966).
- (33) Zetterström, R.: Carbohydrate metabolism and the role of the liver.
Ciba F.S. 59 (1961).

Geboren wurde ich am 8. März 1948 in Tübingen als viertes von fünf Kindern des Hans Friedrich-Frekxa, damals Assistent am Max-Planck-Institut für Virusforschung, und seiner Frau Elisabeth Friedrich-Frekxa, geb. Pütz, Ärztin.

Nach vierjährigem Grundschulunterricht trat ich im Frühjahr 1958 in das altsprachliche Uhlandgymnasium Tübingen ein und verließ es nach dem Abitur im Oktober 1966. Im folgenden Winter begann ich an der Universität Tübingen das Medizinstudium, legte dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab und setzte nach dem dritten Semester das Studium an der Universität Kiel fort, wo ich im Sommer 1969 das Physikum bestand. Den ganzen klinischen Teil des Studiums verbrachte ich an der Technischen Universität München und befaßte mich zugleich mit der Doktorarbeit im Stoffwechsellabor des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals München. Nach Abschluß des Staatsexamens im Dezember 1972 war ich bis Ende des Jahres 1974 als Medizinalassistentin in den Fächern Dermatologie, Chirurgie und Innere Medizin tätig und bin seit Januar 1975 Assistentin an der Sportmedizinischen Untersuchungsstelle der Universität Tübingen.

